

# 新城疫病毒对癌细胞的杀伤作用

赵铁军 ,田伏洲 ,李小军 ,刘晓波 ,尹志良

摘 要 :目的 探讨新城疫病毒 NDV 对癌细胞的直接杀伤作用。方法 将 NDV 与各组细胞的混悬液一起加入细胞培养板中三孔法 ,同时设不加 NDV 的对照孔 ,经 8、16、24、36 和 48 小时五个时相观测细胞生长情况和病毒复制情况。结果 成纤维细胞和对照组细胞生长良好 ,而实验孔的各组癌细胞逐渐减少 ,出现融合、裂解。48 小时癌细胞组的上清液病毒效价较高而成纤维细胞的上清液病毒效价为 0。结论 NDV 对癌细胞有较强的亲和力 ,可在癌细胞内大量复制 ,具有直接杀伤癌细胞的作用 ,而对正常细胞无明显的杀伤作用。

关键词 :新城疫病毒 ;人类癌细胞 ;杀伤作用

中图分类号 :R73-35+1 文献标识码 :A 文章编号 :1000-8578(2000)02-0117-

02

新城疫病毒(Newcastle disease virus ,NDV)属副粘病毒型 ,是一种鸡瘟病毒 ,易检测和获得 ,国外一些学者发现 NDV 对动物黑色素瘤 ,神经纤维瘤等 ,有抑制肿瘤的作用<sup>[1]</sup>。我们实验室以往将 NDV 注入原发性肝癌(H<sub>22</sub> ,腹水瘤)小鼠腹腔 ,发现肿瘤缩小 ,小鼠存活数增加<sup>[2]</sup>。Reichard 等 ,在体外实验中 ,发现一种特殊的 NDV(73-T)能直接杀灭肿瘤细胞<sup>[3]</sup> ,而其它毒种的 NDV 直接杀癌作用尚未见报道。据此 ,我们研究了 NDV 对多种癌细胞的杀伤作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 病毒和细胞

将 NDV HB<sub>1</sub> 原液(购自农业部成都药械厂)接种于鸡胚尿囊腔 ,在 37℃ CO<sub>2</sub> 恒温箱中孵育 24 小时 ,取出尿囊液 ,在 5000 转/分转速下离心 5 分钟 ,取上清其鸡血凝效价为 1:1280 ,分装于无菌试管中于-20℃ 中保存。人肝癌细胞系 SMMC-7721 ,人胃癌细胞系 SGC-9701 ,人胰癌细胞系 PC-3 ,人宫颈癌细胞系(Hela 细胞)和人正常成纤维细胞 ,用 1640 培养液在 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 恒温箱中培养。

### 1.2 实验过程和检测指标

将以上各细胞系 ,在培养瓶中用 0.25% 胰酶消化成混悬液 ,以 1×10<sup>4</sup>/100μl/孔加入培养板中(三孔法) ;用培养液稀释 NDV-HB<sub>1</sub> 毒种 ,使其效价为 1:160 ,取 50μl 分别加入各孔 ,将培养板放入 37℃ CO<sub>2</sub> 恒温箱中培养。每系细胞各设对照孔(仅加培养液 ,不加 NDV) 。设定 8 ,16 ,36 和 48 小时几个时相。①显微镜下观察各时相点细胞生长情况 ;②每时相点观察 100 个细胞按公式 :

细胞贴壁率(%) = (实验组贴壁细胞数 / 全部细胞数 - 对照组贴壁细胞数 / 全部细胞数) × 100%

计算细胞贴壁率 ;③移取 48 小时上清液 ,检测其中病毒效价 ;④用 MTT 法染色 ,在酶标仪上测定细胞增殖性 ,按公式 :

细胞增值率(%) = (实验组 OD 值 / 对照组 OD 值) × 100%

计算 ;⑤于 48 小时 ,观察 100 个细胞 ,按公式 :

细胞融合率(%) = (实验组多核体内的核数 / 全部细胞内的核数 - 对照组多核体的核数 / 全部细胞内的核数) × 100%

计算细胞融合率。

## 2 结果

### 2.1 显微镜观察结果

光镜下成纤维细胞和对照组肿瘤细胞生长良好 ,8 小时甚至更早即开始贴壁生长 ,而实验组的肿瘤细胞贴壁晚且少 ,随时间推移 ,细胞量逐渐减少 ,出现细胞融合、裂解。

### 2.2 细胞贴壁率(见表 1)

表 1 NDV 对细胞贴壁率(%) 的影响

| 小时        | 8  | 16 | 24 | 36 | 48 |
|-----------|----|----|----|----|----|
| 成纤维细胞     | 87 | 95 | 92 | 88 | 81 |
| SMMC-7221 | 77 | 82 | 74 | 36 | 27 |
| SGC-9701  | 81 | 85 | 78 | 31 | 28 |
| PC-3      | 76 | 78 | 67 | 37 | 29 |
| Hela      | 85 | 81 | 76 | 44 | 31 |

### 2.3 细胞增殖率(见表 2)

表 2 NDV 对细胞增殖率(%) 的影响

| 小时        | 8  | 16 | 24 | 36 | 48 |
|-----------|----|----|----|----|----|
| 成纤维细胞     | 91 | 96 | 92 | 88 | 80 |
| SMMC-7221 | 95 | 85 | 71 | 39 | 20 |
| SGC-9701  | 94 | 81 | 77 | 28 | 32 |
| PC-3      | 88 | 82 | 69 | 41 | 32 |
| Hela      | 92 | 83 | 64 | 47 | 28 |

2.4 48 小时病毒效价、细胞融合率(见表 3)

| 表 3      | 细胞融合率和病毒效价 |           |          |      |      |
|----------|------------|-----------|----------|------|------|
|          | 成纤维细胞      | SMMC-7721 | SGC-9701 | PC-3 | Hela |
| 融合率(%)   | 2.1        | 13.5      | 8.3      | 9.3  | 10.8 |
| 病毒效价(1:) | 0          | 640       | 320      | 640  | 640  |

3 讨论

NDV 在在体实验中有明显的抑癌作用 ,Bohle 等研究证实 NDV 感染后的癌细胞被灭活后具有疫苗作用 ,认为可激活淋巴细胞 ,并可促使白细胞介素、干扰素等细胞因子大量释放<sup>[4]</sup>。其瘤苗作用当前研究较多 ,国内亦有同类报道<sup>[5]</sup>。还有研究发现 NDV 能增强肝癌小鼠腹腔巨噬细胞的吞噬功能<sup>[6]</sup>。

在国外已有在人体试用 NDV 治疗肿瘤的尝试 ,取得一定疗效<sup>[1]</sup>。本中心将 NDV 用于晚期肿瘤的治疗 ,亦取得较好疗效 ,发现 NDV 可使患者的淋巴细胞转化率和 E 玫瑰花环转化率增高 ,且使肿瘤缩小 ,肝癌患者血液甲胎蛋白含量降低(即将报道)。

从结果中可见 ,NDV 可抑制细胞的贴壁 ,对细胞的抑制是逐渐增强的 ,以 48 小时最为明显。细胞的贴壁率和细胞增殖性是反映细胞生长的相辅相成的两个方面。肿瘤细胞的增殖也随时间推移而下降。

在 48 小时 ,肿瘤细胞培养上清液中 NDV 效价很高 ,超过初始加液的效价 ,表明 NDV 可在肿瘤细胞内复制。NDV 还可促使肿瘤细胞融合 ,而细胞裂解常常随后发生 ,Lorence RM 等证实了这一点<sup>[7]</sup>。

肿瘤组织中除肿瘤细胞外为间质细胞 ,间质细胞中又以成纤维细胞为主。NDV 对正常的成纤维细胞的贴壁率和增殖性影响很小 ,它导致的细胞融合率亦低 ,而且在 48 小时 ,上清中病毒效价为 0 ,表

明 NDV 不能在正常成纤维细胞中复制 ,也不能杀伤正常成纤维细胞。这一点启示我们 ,用 NDV 治疗肿瘤 ,尤其局部应用时 ,NDV 对正常组织细胞是安全无害的。成纤维细胞的贴壁率和增殖性随时间推移似有下降趋势 ,可能与培养液中养料消耗有关。

根据以上 ,表明 NDV 对肿瘤细胞有比较特异的亲和力 ,可在肿瘤细胞内大量复制 ,具有直接杀伤肿瘤的作用。

参考文献 :

[ 1 ] Sinkovics J and Horvath J. New developments in the virus therapy of cancer :a historical review[ J ]. Intervirology ,1993 ,36 :193 ~ 214.

[ 2 ] 尹志良 ,刘晓波 ,田伏洲 ,等 . NDV/MC 联合治疗小鼠 H<sub>22</sub>腹水瘤的实验研究[ J ]. 西南国防医药 ,1998 ,8 :4~6.

[ 3 ] Reichard KW ,Lorence RM ,Cascino CJ ,et al. Newcastle disease virus selectively kills human tumour cells[ J ]. J Surg Res ,1992 ,52 :448~453.

[ 4 ] Bohle W ,Schlag P ,Liebrich W ,et al. Postopera-tive active specific immunization in colorectal cancer patients with virus modified autologous tumor cell vaccin[ J ]. Cancer ,1990 ,66 :1517~1523.

[ 5 ] 曲增强 ,吴孟超 ,陈汉 ,等 . 新城疫病毒瘤苗对荷瘤小鼠的主动免疫作用[ J ]. 实用癌症杂志 ,1996 ,11 :73~75.

[ 6 ] 白莲花 ,于春 ,顾芳 ,等 . 新城疫病毒激活的鼠巨噬细胞对肝癌细胞( H<sub>22</sub>)杀伤作用的探讨[ J ]. 癌症 ,1998 ,17 :262~264.

[ 7 ] Lorence RM ,Reichard KW ,Cascino CJ ,et al. Selective replication of Newcastle disease virus ( NDV ) in cancer cells is associated with virus-induced cell fusion( abstract 2378 I J ). Proc Am Assoc Cancer Res ,1992 ,33 :398.

Killing Effect of Newcastle Disease Virus( NDV ) on Human Tumour Cells

ZHAO Tie-jun ,TIAN Fu-zhou ,LI Xiao-jun ,et al

PLA Center of General Surgery ,General Hospital of Chengdu Command ,Chengdu 610083 ,China

**Abstract** **Objective** Study on direct killing effect of NDV on human tumour cells. **Methods** NDV was added into the culture dishes of human cell lines of hepatic carcinoma ,gastric carcinoma ,pancreatic carcinoma ,cervical carcinoma and normal fibroblast ,repectively ,and control groups were set as well . The status of growth and replication of virus was measured and observed at 8 ,16 ,24 ,36 and 48 hr. **Results** Fibroblast cells and control group cells grew well ,whereas the growth of tumour cells in experimental groups reduced gradually ,and cells fusion and lysis appeared. At 48 hr ,virus titer in tumour cell supernatant was comparatively high while it was zero in fibroblast supernatant. **Conclusion** NDV has comparatively strong affinity with tumour cells ,andit can replicate in tumour cells ,and can kill tumour cells directly. It is innocuous to normal cells.

**Key words** :NDV ;Human tumour cells ;Killing effect